

Neue für das lysR2-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

- Gegenstand der Erfindung sind für das lysR2-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, durch Abschwächung des lysR2-Gens. Das lysR2-Gen kodiert für das LysR2-Protein, welches ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist.

Stand der Technik

- L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

- Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

- Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, bereitzustellen.

10 Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR2-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 15 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
- 20 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
- 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR2 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen
- 10 hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptides nicht verändern.

Weitere Gegenstände sind

- 15 a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1 und 231,
- b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15
- 20 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 232 und 1161,
- c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der
- 25 Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1162 und 1364.

Weitere Gegenstände sind:

- ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,
- enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1
- 30 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

- 5 ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz

und coryneforme Bakterien, in denen das lysR2-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist

- 10 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält
15 mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

- Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um
20 Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das LysR2-Protein kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des lysR2-Gens aufweisen. Sie
25 sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren und zu bestimmen

- Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-
30 Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das LysR2-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt

mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt
mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende
Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit
einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38,
5 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49
oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch
Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150,
200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld
10 herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf
Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es
sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte
RNA oder DNA handeln kann.

15 Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus
hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu
wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis
85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90% und ganz
20 besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder
99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1
oder einem daraus hergestellten Fragment.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine,
die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
25 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid
gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der
biologischen Aktivität des LysR2-Proteins und auch solche
ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens
30 81% bis 85% und besonders zu wenigstens 86% bis 90% und
ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97%
oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No.
2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, insbesondere L-Lysin und L-Valin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das lysR2-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen bzw. Allel oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 5 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Brevibacterium flavum ATCC14067
 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
- 10 Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

- Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
 Brevibacterium flavum FERM-P 1708
 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
 15 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
 Corynebacterium glutamicum DM58-1
 Corynebacterium glutamicum DG52-5
 Corynebacterium glutamicum DSM 5715 und
 20 Corynebacterium glutamicum DSM 12866

- oder wie beispielsweise die L-Valin produzierenden Stämme
- Corynebacterium glutamicum DSM 12455
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 9325
 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 9324
 25 Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 1763.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das LysR2-Protein kodierende lysR2-Gen von *C. glutamicum*, welches ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist, zu isolieren.

- Zur Isolierung des lysR2-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses
- 30 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als

- Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine
- 5 Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al.
- 10 (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHc79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).
- Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli
- 20 können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial
- 25 Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).
- Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren
- 30 klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of

Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von
5 Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das lysR2-Gen kodierende
10 DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die
15 sich ergebende Aminosäuresequenz des lysR2-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch
20 die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative
25 Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist
30 bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene
35 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences

3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des lysR2-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des lysR2-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation)

der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.

Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in
5 der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191
10 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
15 Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind
20 aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus
25 Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und
30 Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von
35 der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die

Enzymaktivität wird von Fehlsinmmutationen (missense mutations) oder Nichtsinmmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu

- 5 Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung
- 10 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und
- 15 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

- Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology
- 20 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung (gene disruption) und des Gen-Austauschs (gene replacement).

- Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen
- 25 Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder
- 30 pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al.,
- 35 Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder

pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des *recA*-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

In Figur 1 ist beispielhaft der Plasmidvektor pCR2.1lysR2int gezeigt, mit Hilfe dessen das *lysR2*-Gen unterbrochen bzw. ausgeschaltet werden kann.

Bei der Methode des Genaustausches (gene replacement) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde

beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

- 5 In das *lysR2*-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

- 10 Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *lysR2*-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphat-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

- 15 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein)
- 20 mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- 25 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
- das für die Enolase kodierende Gen *eno* (DE: 19947791.4),
- das für das *zwf*-Genprodukt kodierende Gen *zwf* (JP-A-09224661),

- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen *pyc* (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))

- das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*
5 (DE-A-195 48 222)

- das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC* (EP-B-0387527; EP-A-0699759)
- das für das Zwal-Protein kodierende Gen *zwal* (DE: 199 59 328.0, DSM 13115)

- 10 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Valin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene bzw. Allele, ausgewählt aus der Gruppe

- gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase kodierenden Gene *ilvBN* (Keilhauer et al., (1993) Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), oder
 - gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende *ilvD*-Gen (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979), oder
 - gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende *mgo*-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998))
- 20

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren,
- 25 insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des *lysR2*-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478, DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE:1995 1975.7, DSM 13114)
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113),

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten.

- 10 Schließlich kann es für die Produktion von L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des *lysR2*-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom* (EP-A-0131171),
- 15 • das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen *thrB* (Peoples, O.W., et al., Molecular Microbiology 2 (1988): 63 - 72), und
- das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen *panD*
- 20 (EP-A-1006192)

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten.

- Die Abschwächung der Homoserin-Dehydrogenase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch den Austausch von L-Valin gegen L-Alanin, L-Glycin
- 25 oder L-Leucin an Position 59 des Enzymproteins, durch den Austausch von L-Valin gegen L-Isoleucin, L-Valin oder L-Leucin an Position 104 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Asparagin gegen L-Threonin oder L-Serin an Position 118 des Enzymproteins erreicht werden.

Die Abschwächung der Homoserin-Kinase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch den Austausch von L-Alanin gegen L-Valin, L-Glycin oder L-Leucin an Position 133 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Prolin gegen L-Threonin, L-Isoleucin oder L-Serin an Position 138 des Enzymproteins erreicht werden.

Die Abschwächung der Aspartat-Decarboxylase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch die Austausche L-Alanin gegen L-Glycin, L-Valin oder L-Isoleucin an Position 36 des Enzymproteins erreicht werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR2-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im

Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose,

- 5 Fructose, Maltose, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum
- 10 Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff

- 15 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,

- 20 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.
- 25 Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen
- 30 Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak

- 35 beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise

eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende
5 Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei
10 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem
15 Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei
20 Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Eine Reinkultur des folgender Mikroorganismus wurde am 28. Juli 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß
25 Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm TOP10F/pCR2.1lysR2int als DSM 13617.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin.
30

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

- (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)
- 5 durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al.

10 entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032

- Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei
- 15 Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche
- 20 Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
- 25 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
- 30 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.

Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04)

- 5 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- 10 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)
- 15 beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens lysR2

- Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrmp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

- Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990,

- 5 Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem
- 10 "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

- Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter
- 15 Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem
- 20 Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology
- 25 Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

- Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 933 Basenpaaren, welches als lysR2-Gen bezeichnet wurde. Das lysR2-Gen kodiert für ein
- 30 Polypeptid von 310 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des lysR2-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des lysR2-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 4 und SEQ ID No. 5):

- 10 lysR2intA:
5'CCA TCG TCG CAG AAT TCA AC 3'
lysR2intB:
5'GCT TCT TCG GCT AAT GCA TC 3'

- Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 439 bp großes internes Fragment des lysR2-Gens isoliert, welches in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.
- 15
- 20

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

- 25
- Anschließend wurde der *E. coli* Stamm TOP10F mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989),
- 30

- der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft.
- 5 Das Plasmid wurde pCR2.1lysR2int genannt.

Beispiel 4

- Integrationsmutagenese des lysR2-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715 bzw. in dem Valinproduzenten FERM BP-1763
- 10

- Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1lysR2int wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al.(FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in Corynebacterium glutamicum DSM 5715 bzw. Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten (EP-B-435 132). Bei dem Stamm FERM BP-1763 handelt es sich um einen Isoleucin und Methionin bedürftigen Valin-Produzenten (US-A-5,188,948). Der Vektor pCR2.1lysR2int kann in DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1lysR2int erfolgte durch
- 15 Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.
- 20
- 30 Für den Nachweis der Integration wurde das lysR2int-Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.

Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen SalI, SacI und HindIII geschnitten.

- 5 Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybrisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1lysR2int hatte innerhalb des chromosomalen lysR2-Gens ins Chromosom von DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 inseriert. Die Stämme wurden als DSM5715::pCR2.1lysR2int bzw. FERM BP-1763::pCR2.1lysR2int bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von L-Lysin und L-Valin

- 15 Die in Beispiel 4 erhaltenen C. glutamicum bzw. B. lactofermentum Stämme DSM5715::pCR2.1lysR2int und FERM BP-1763::pCR2.1lysR2int wurden in einem zur Produktion von L-Lysin und L-Valin geeigneten Nährmedium kultiviert und der L-Lysin- bzw. L-Valingehalt im Kulturüberstand bestimmt.
- 20 Dazu wurden die Stämme zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die
- 25 Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

5 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH ₄) ₂ SO ₄)	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
CaCO ₃	25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte CaCO₃ zugesetzt. Für die Kultivierung von DSM 5715 wurde dem Medium zusätzlich 0,1 g/l Leucin zugesetzt. Für die Kultivierung von FERM BP-1763 wurden zusätzlich 0,1 g/l Isoleucin und 0,1 g/l Methionin zugesetzt.

- 10 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete L-Lysin- bzw. L-Valinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma
 5 Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In den Tabellen 1 bzw. 2 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt.

10

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	7,5	13,01
DSM5715::pCR2.1lysR2int	7,2	14,68

Tabelle 2

Stamm	OD(660)	Valin g/l
FERM BP-1763	12,1	7,49
FERM BP-1763::pCR2.1lysR2int	13,4	10,90

15

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1lysR2int.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR:	Kanamycin Resistenz-Gen
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys EcoRI
lysR2int:	internes Fragment des lysR2-Gens
ColE1 ori:	Replikationsursprung des Plasmids ColE1

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR2-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR2 aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder

5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den
Sequenzen (i) oder (ii) komplementären
Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in
(i), die die Aktivität des
Proteins/Polypeptids nicht verändern.

10 5. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID Nr. 1 dargestellt.

6. Vektor pCR2.1lysR2int, der

15 6.1 ein 439 bp großes internes Fragment des citA-Gens
trägt,

6.2 dessen Restriktationskarte in Figur 1
wiedergegeben wird, und

20 6.3 der in dem E.coli-Stamm TOP10F/pCR2.1lysR2int
unter der Nr. DSM 13617 bei der Deutschen
Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
hinterlegt ist.

25 7. Coryneforme Bakterien, in denen das lysR2-Gen
abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird,
insbesondere durch Deletion.

8. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Lysin und L-Valin,
dadurch gekennzeichnet,
30 dass man folgende Schritte durchführt,
a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Bakterien, in denen man zumindest
das lysR2-Gen abschwächt,

b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium
oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

- 5 9. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich
weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-
Aminosäure verstärkt.
- 10 10. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Bakterien einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
verringern.
- 15 11. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man die Expression des (der) Polynukleotids(e),
das (die) für das lysR2-Gen kodiert (kodieren)
verringert, insbesondere ausschaltet.
- 20 12. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man die regulatorischen Eigenschaften des
Polypeptids herabsetzt, für das das Polynukleotid
lysR2 kodiert.
- 25 13. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Lysin, Bakterien fermentiert, in denen
man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe
- 30 13.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,

- 13.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 13.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,
- 13.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 5 13.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 13.6 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC
- 13.7 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 verstärkt, bevorzugt überexprimiert.
- 10 14. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 15 14.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,
- 14.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi,
- 14.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB,
- 14.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2,
- 20 14.5 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 14.6 das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen thrB, und
- 25 14.7 das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen panD
- abschwächt, insbesondere ausschaltet.

15. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Valin, Bakterien fermentiert, in denen
5 man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe
- 15.1 die für die Acetohydroxysäuresynthase
kodierenden Gene ilvBN,
- 15.2 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende
10 ilvD-Gen,
- 15.3 als für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende
mqo-Gen
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
15 Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum bzw. Brevibacterium lactofermentum
einsetzt.
- 20 17. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder
Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator
LysR2 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der
Sequenz des lysR2-Gens aufweisen,
- 25 dadurch gekennzeichnet,
dass man die Polynukleotidsequenzen gemäß den
Ansprüchen 1 bis 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet, daß man
30 arrays, micro arrays oder DNA-chips einsetzt.

Neue für das lysR2-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Zusammenfassung

Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

- und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in
- 20 denen zumindest das lysR2-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungs sonden.